动 物 学 研 究 2009，Dec. 30(6):620-626 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2009.06620

# 养殖大黄鱼一个繁育群体亲本亲缘关系剖析

常玉梅[1]，徐万土[2]，池炳杰[1,3]，高国强[1,3]，韩启霞[1,3]，何 薇[4]，孙效文[1]，梁利群[1,*]

（1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所，黑龙江 哈尔滨 150070；2. 象山港湾水产苗种有限公司，象山 315702；
3. 上海海洋大学 水产与生命学院，上海 201306；4. 大连水产学院 生命科学与技术学院，辽宁 大连 116023）

**摘要：**该文利用 23 个微卫星标记对 103 尾大黄鱼繁育亲本进行遗传多样性检测和亲缘关系重建分析，并构建繁育体系指导大黄鱼配组。遗传多样性检测显示，103 尾亲鱼在 23 个座位共获得等位基因数 134 个，平均 5.82 个，总平均观察杂合度 0.5993，表明该繁育群体尚保持一定水平的遗传多样性。采用似然率和组合优化法统计模型重建的同胞关系不尽相同，但结果均证实了这些繁育亲本亲缘关系十分相近。配组比对分析结果显示，两种方法的配组方案一致性高达 85%，最终选择组合优化法的分组方案指导大黄鱼配组繁育。

**关键词：**大黄鱼；微卫星标记；亲缘关系；近交
**中图分类号：**Q347; Q959.483 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2009)06-0620-07

# Kinship Analysis of One Broodstock Population of Large Yellow Croaker *Pseudosciaena crocea*

CHANG Yu-mei[1], XU Wan-tu[2], CHI Bing-jie[1,3], GAO Guo-qiang[1,3], HAN Qi-xia[1,3], HE Wei[4], SUN Xiao-wen[1], LIANG Li-qun[1,*]

(1. *Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin* 150070, *China;* 2. *Xiangshan Seaport Aquatic Seedling&fingerling Limited Company, Xiangshan* 315702, *China;* 3. *College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306, *China*；4. *Life Science of Technology Institute, Dalian Fisheries University, Dalian* 116023, *China*)

**Abstract:** Present broodstocks of large yellow croaker are borne from extremely small numbers of base population. Thus, it is necessary to analyze kinship of broodstocks in order to avoid inbreeding that will bring out the reduction of individual survival and growth. This paper reports kinship reconstruction and genetic diversity in 103 broodstocks of large yellow croaker by utilizing 23 microsatellite markers. Genetic diversities of 103 croakers at 23 loci pronounce that there are 134 alleles in total and an average of 5.82, and the observed average heterozygosity of 0.5993, demonstrating that these broodstocks still maintain genetic variability to some extent. The results of sibling groups reconstructed are not identical using two methods of Likelihood and 2-allele recombinatorial optimization. However, the evidence of close relationship between broodstocks is confirmed. The mating combinations are compared between these two methods, as a result of 85% identity and a final selection of 2-allele method. This study aims at finding a better way to avoid inbreeding occurred in broodstocks, and facilitating the aquaculture market of large yellow croaker, meanwhile, offering methods and statistical models to artificial propagation in other marine fish species.

**Key words:** Large yellow croaker; Microsatellite markers; Kinship; Inbreeding

大黄鱼（*Pseudosciaena crocea*）曾经是我国著名的“四大海产”之一和主要的出口创汇品种。所以，大黄鱼主产海区的渔民在经济利益驱使和对大黄鱼资源的保护意识淡漠情况下，多年酷捕的生产方式使目前野生大黄鱼资源几近枯竭(Xu & Liu, 2007)。据此，人们开始捕捞野生个体进行大黄鱼人工苗种繁育以满足生产需求。1985 年，大黄鱼人工繁殖获得重大突破，苗种问题基本得到解决，大黄鱼养殖产业在我国浙、闽两省沿海地区迅速发展壮大（Zhang et al, 2002）。历经 20 余年，虽然大黄鱼

收稿日期：2009-05-11；接受日期：2009-09-15
基金项目：国家“863”计划资助项目(2006AA10A405)
*通讯作者(Corresponding author)，E-mail: llq-1019@163.com
第一作者简介：常玉梅，女，博士，研究方向: 鱼类分子生物学与基因工程育种。E-mail:ymchang2002@sohu.com

养殖业有了很大的发展，但由于种质保存和良种选育技术的滞后，在进行大黄鱼人工繁育初期，并未对捕捞群体进行亲缘关系分析，也未在后续的累代繁殖中通过重建遗传系谱来规避近亲交配，加上养殖环境的恶化，使目前大黄鱼养殖群体出现抗逆性差、生长速度下降等问题。因此，在无法获得足够数量的野生个体对繁殖群体进行新的遗传资源补充的情况下，利用合适的分子遗传学和统计学方法对现有养殖繁育亲本进行亲缘关系剖析，以最大程度地避免因近交引发的成活率和生长速率的下降的现状是非常必要的。

在诸多可以用于系谱重建的分子标记中，微卫星标记是应用最广泛而且优势颇多的一种分子标记。与显性标记 AFLP 和 ISSR 标记相比，微卫星标记的等位基因是共显性的，所以可以直接推算出每个座位的等位基因频率和基因型。同时，随着数理统计和相关软件的开发利用，目前进行亲缘关系分析的统计模型或软件几乎都是以微卫星标记的遗传特点设计的（Norris et al, 2000; Sekino et al, 2003; Li et al, 2003），这为水产养殖繁育亲本亲缘关系剖析提供了强大的技术支撑。本研究利用 DNA 微卫星标记对大黄鱼亲本进行亲缘关系剖析和重建，通过比较两种截然不同的统计模型的运算结果，以避免近亲交配为原则，试图摸索出一套指导大黄鱼人工繁育的科学有效的方法，同时可为其它海水养殖品种的人工繁育研究和生产提供可借鉴的技术方法。

## 1　材料与方法

### 1.1　繁育亲本来源

岱衢族大黄鱼 3 龄繁育亲本于 2009 年 1 月 13 日采自宁波象山港湾水产苗种有限公司（原宁波市海湾水产苗种繁育中心），共 105 尾。这些样本是该公司 2007 年 12 月从养殖户收购的体质健壮的后备亲鱼。其中雌性个体 76 尾，雄性个体 29 尾，雌雄比例为 2.5∶1。采样时，对每条亲鱼进行麻醉后，打入电子标签(广州洪腾)，并剪取少量背鳍于无水乙醇中保存。 对照组亦为同批收购的 3 龄后备亲鱼。

### 1.2　基因组 DNA 的提取

剪取适当大小无水乙醇固定的大黄鱼背鳍至离心管中， 双蒸水洗涤 3~4 次， 每次间隔约 10 min。待乙醇全部挥发后，用滤纸吸干水分，转入新管； 每管加入 200 μL 新鲜配制的细胞裂解液（成份：200 μg/mL 蛋白酶 K；0.5%十二烷基肌氨酸钠；10 mmol/L EDTA）于 50℃的保温箱中消化 1~2 h，期间缓慢地上下颠倒 1~2 次。消化后的样品加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇（25∶24∶1），缓慢抽提 3 次；抽提后的 DNA 样品加入 2 倍体积预冷的无水乙醇沉淀，并用 70%乙醇洗涤两次；干燥后的 DNA 沉淀加入适量的 TE 溶解，并于 4℃保存备用。

### 1.3　微卫星引物来源

本研究的微卫星引物有两部分组成：编号为“HLJDH”系列由本实验室自主开发（Chang et al, 2008）；编号“LYC”系列参见文献(Guo et al, 2005; Ning et al, 2007)。所有引物由宝生物工程（大连）有限公司合成(表 1)。

### 1.4　PCR 扩增及检测

建立 15 μL 反应体系， 体系组分参见文献（Chang et al, 2008a）。 所有 PCR 反应均在 ABI 9700 热循环仪上完成。 PCR 程序如下：首先 94℃预变性 3 min；随后进行 28 个循环扩增，92℃ 20 s, 50~60℃ 20 s（表 1）, 72℃ 30 s；最后 72℃延伸 10 min。

扩增产物在垂直电泳槽 DYCZ-28D（胶板大小为 180 mm×150 mm×200 mm，北京六一）上进行 8%或 10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕后，参考 Xu et al（2002）的方法进行银染，扫描后保存图像。所有图像采用 Gel-Pro Analyzer ver.4.5 进行手动分析。

### 1.5　繁殖群体遗传多样性分析

利用群体遗传学软件Popgene（Yeh & Yang, 1999） 计算繁育亲本在每个微卫星座位的等位基因数（$N_a$）、有效等位基因数（$N_e$）、观察杂合度（$H_o$）和期望杂合度（$H_e$）；利用软件Genepop (Rousset, 2007)的$P$值检测该繁育群体是否偏离哈德-温伯格平衡以及两两座位间是否存在连锁不平衡。

### 1.6　同胞关系重建（siblings reconstruction）

本研究所用实验材料虽然是从养殖户收购的，但是这些大黄鱼亲本实际上是苗种繁育中心于 2006 年 3 月培育的同一批苗种。所以，这批繁育亲本只能存在同胞关系，不可能存在父（母）子关系，所以我们需要对这些个体进行同胞关系重建，然后根据结果再进行配组繁育。本研究分别采用两种统计模型进行同胞关系（全同胞或半同胞）重建分析。

1.6.1 基于基因频率的似然率（Likelihood）算法 根据 Goodnight & Queller (1999)提出的似然率（Likelihood）算法构建同胞关系，通过设定主要假设和无效假设对该繁育群体可能存在的两种系谱关系进行评估。关系一：全同胞（以下简称 FS）和半同胞/无关系（HS/UR）；关系二：半同胞（HS）

表 1 大黄鱼微卫星引物信息
**Tab. 1 Primer pairs of microsatellite markers in large yellow croaker**

| 标记<br>Loci | 引物序列<br>Primer sequences | 退火温度（℃）<br>Annealing temperature | 登录号<br>GenBank accession no. |
|---|---|---|---|
| LYC0002 | F:ACCTCCAGTGGGATGTGA<br>R:GGCTGTTTGTTATAATTTGTG | 50 | AY885692 |
| LYC0003 | F:TATTCAGGCTGCTGTTGTGC<br>R:ATGACCAGGCTTGCATTGAG | 55 | AY885693 |
| LYC0004 | F:CTCTTAGCCGTCATTCATCC<br>R:CATTTAGCCAAGTTCACTTCC | 55 | AY885694 |
| LYC0006 | F:GGTCAACAGGTCAGCAGTTA<br>R:GCATCTCTCCTTCAAGTCAC | 55 | AY885696 |
| LYC0007 | F:GACTCCTTTGCTCGGTCTGA<br>R:ACATGGTTATCCTTCCGTTCG | 55 | EF372242 |
| LYC0009 | F:GTCAATCACGTCTGTCTCTGC<br>R:TCAGCCATTGTCTGTGAGGT | 60 | EF372244 |
| LYC0011 | F:CTTTTATTGGCTCCGTATGA<br>R:CACTCACACTAGCACGCAC | 56 | EF372246 |
| LYC0012 | F:CAGAACAAACAATGAATGGG<br>R:GAGGAGCTCAACAGCAACA | 55 | EF372247 |
| LYC0013 | F:GCTGCGAGCTACTTTACTCAT<br>R:AACTCACAAACATGCAC | 50 | EF372248 |
| LYC0020 | F:GCCAAACATGGAGCCTTATG<br>R:GACTATCATCAACTGAAACAAC | 55 | EF372255 |
| LYC0024 | F:GGCTCGTGCCAGCAGGG<br>R:GTATGAAGAACATGTGCAGTG | 56 | EF372259 |
| LYC0030 | F:GAGACGAGGAGAGGCAGAAG<br>R:CACCATGGTAGAAAGAGCACAG | 60 | EF372265 |
| LYC0033 | F:GGATGGAGGAGTGATGATGG<br>R:GCACTGAGACCTGAATGCTCC | 55 | EF372268 |
| HLJDH085 | F:AATGTTCACTGCGATGACTCC<br>R:TCCTCCATGTGCAGTTACCA | 56 | EU590671 |
| HLJDH107 | F:ATTCTTCTGCCCCTCCAAAT<br>R:ACTCCCCTGATGCGTCTCTA | 56 | EU590672 |
| HLJDH125 | F:ATTCTTCTGCCCCTCCAAAT<br>R:ACTCCCCTGATGCGTCTCTA | 56 | EU590673 |
| HLJDH155 | F:CCGACAGCCATACTTTAC<br>R:CTAGCAGACAGGGAACAT | 58 | FJ860005 |
| HLJDH156 | F:GCTTCAGGAGCCCATTCT<br>R:CGATCAGCCGTAGTGTCT | 55 | EU590677 |
| HLJDH159 | F:AGAAGGGAGGAAAGATGC<br>R:TGCTTGCGAGAAAGACAC | 58 | FJ860006 |
| HLJDH175 | F:GGTATCATTCCTCCACTTT<br>R:CACTCATCTCCAGCACAA | 55 | EU590678 |
| HLJDH182 | F:ACTGTCGTGCTGCCTTGT<br>R:TACGCTTGATTGTCTGTGCT | 55 | EU590679 |
| HLJDH185 | F:CTGACTCTGAACGCTTGG<br>R:TTCTGTGGTCGTCGTCTT | 55 | EU590680 |
| HLJDH330 | F:TCAAGTTCAAATCAGCCCAGTT<br>R:ATCGCAGCTTAGCGCAGT | 58 | FJ860007 |

和全同胞/无关系(FS/UR)。上述运算在软件 Kingroup v2.08 (Konovalov et al, 2004)中完成，并通过 5000 次的模拟运算进行*P*值显著性检验，结果采用半矩阵形式输出。

1.6.2　基于 2-allele 的组合优化（combinatorial optimization）算法　与似然率法不同的是，组合优化法不需要群体等位基因频率信息，也不需要对交配体系进行假设评估，该法通过利用基于孟德尔遗传规律的 2-allele minimum set cover 算法从研究样本中找出最少的同胞对数目(Almudevar & Field, 1999; Berger-Wolf et al, 2007)。本研究利用 Ashley et al (2009)最新发布的网上在线软件 Kinalyzer（http://kinalyzer.cs.uic.edu）完成同胞对的构建。

## 2　结　果

### 2.1　DNA 模板及微卫星引物的有效性

通过分析 105 尾大黄鱼个体的 25 对微卫星指纹图谱发现，有两个个体（编号 42♂和 102♀）在所有标记中条带缺失严重，故予以淘汰。另外，标记 LYC0018 在所有检测个体中均为单态，而标记 LYC0036 在大部分个体中无扩增带，因此这两个标记也被淘汰。最后有 103 尾个体（28♂+75♀）及 23 对微卫星引物提供的等位基因信息进行了后续的遗传多样性和同胞关系重建分析。

### 2.2　遗传多样性

103 尾亲鱼在 23 个座位共获得等位基因数 134 个，平均每个座位 5.82 个。其中座位 LYC0033 只有两个等位基因，而 HLJDH159 的等位基因最多，共 11 个（表 2)。有效等位基因的分布情况基本与观察等位基因分布保持一致。每个座位的平均观察杂合度为 0.1209~0.9029，平均期望杂合度为 0.1136~0.8929，其中有 6 个座位（LYC0030、

**表 2　103 尾大黄鱼繁育个体在 23 个微卫星座位的遗传多样性信息**

**Tab. 2 Genetic diversities of 103 individuals of large yellow croaker at 23 microsatellite loci**

| 座位 Loci | 等位基因 $N_a$ | 有效等位基因 $N_e$ | 观察杂合度 $H_o$ | 期望杂合度 $H_e$ | *P* 值 *P* value |
|---|---|---|---|---|---|
| LYC0002 | 4 | 2.80 | 0.5825 | 0.6434 | 0.0000 |
| LYC0003 | 4 | 1.78 | 0.1373 | 0.4395 | 0.0000 |
| LYC0004 | 6 | 4.40 | 0.4854 | 0.7728 | 0.0000 |
| LYC0006 | 3 | 1.51 | 0.2745 | 0.3374 | 0.0001 |
| LYC0007 | 3 | 2.15 | 0.2680 | 0.5352 | 0.0000 |
| LYC0009 | 8 | 5.74 | 0.7921 | 0.8259 | 0.0534 |
| LYC0011 | 7 | 5.78 | 0.7864 | 0.8268 | 0.0864 |
| LYC0012 | 10 | 8.50 | 0.7087 | 0.8824 | 0.0000 |
| LYC0013 | 7 | 4.83 | 0.5196 | 0.7932 | 0.0000 |
| LYC0020 | 5 | 2.24 | 0.4653 | 0.5537 | 0.1989 |
| LYC0024 | 4 | 2.36 | 0.3789 | 0.5763 | 0.0000 |
| LYC0030 | 3 | 2.43 | 0.6082 | 0.5892 | 0.9899 |
| LYC0033 | 2 | 1.13 | 0.1209 | 0.1136 | 0.4233 |
| HLJDH085 | 9 | 3.33 | 0.6436 | 0.6997 | 0.0012 |
| HLJDH107 | 6 | 3.71 | 0.7100 | 0.7307 | 0.0878 |
| HLJDH125 | 6 | 4.75 | 0.7500 | 0.7896 | 0.0005 |
| HLJDH155 | 6 | 4.88 | 0.7879 | 0.7951 | 0.4160 |
| HLJDH156 | 5 | 2.71 | 0.6500 | 0.6316 | 0.2559 |
| HLJDH159 | 11 | 9.34 | 0.9029 | 0.8929 | 0.0688 |
| HLJDH175 | 6 | 4.30 | 0.7864 | 0.7672 | 0.1574 |
| HLJDH182 | 5 | 3.98 | 0.8835 | 0.7488 | 0.0000 |
| HLJDH185 | 7 | 4.18 | 0.6796 | 0.7608 | 0.1759 |
| HLJDH330 | 7 | 5.49 | 0.8627 | 0.8178 | 0.0539 |
| 平均 | 5.82 | 4.01 | 0.5993 | 0.6749 | |

HLJDH046、HLJDH047、HLJDH049、HLJDH159 和 HLJDH330）的期望杂合度低于观察杂合度，表明这些座位的杂合子过剩；103 尾繁育个体的总平均观察杂合度为 0.5993，期望杂合度为 0.6749，说明该繁育群体尚保持一定水平的遗传变异能力。

哈德-温伯格平衡检测是基于马尔科夫链（Markov chain）方法中的 *P* 值检验。*P* 值检验结果显示 23 个座位中，有 10 个座位偏离平衡（$P<0.0001$），而这些偏离的座位观察后发现均为杂合子缺失。连锁不平衡检验显示，共有 5 组配对检测的座位偏离连锁平衡（$P<0.005$），它们分别是 LYC0012/HLJDH085 、 LYC0012/HLJDH330 、HLJDH107/HLJDH156、HLJDH085/HLJDH330 和 LYC0024/LYC0033。

### 2.3 基于等位基因频率 Likelihood 的同胞重建

当主要假设为 HS，无效假设为 UR/FS，显著检验水平为 0.05 和 0.01 时，共找到 196 对半同胞，很多个体存在交叉重叠配对。通过手动追溯关系链发现，103 尾个体中有 97 尾个体间接存在关联，只有 4 尾个体（60、66、84、92）和一对同胞对（59/93）与其它 97 尾都不存在关系，间接证明了该研究群体亲缘关系十分密切, 与我们所掌握的背景资料相吻合；当主要假设为 FS，无效假设为 UR/HS, 显著检验水平为 0.05 和 0.01 时, 只找到 12 对全同胞，它们之间不存在交叉重叠配对。

### 2.4 基于 2-allele 组合优化法的同胞重建

应用该方法共构建了 45 对同胞组合，其中 30 对是同胞对，包括 3 对兄弟对、13 对姐妹对和 14 对兄妹对；另 15 对是由 3 个个体（trios）构成的 3 胞对，以姐妹组合居多。在这 45 对同胞组合中，12 号雄性个体同时与 1 号和 20 号雄性个体配对，出现重叠；另在 3 胞对中，雌性个体 25 和 83 分别同时与{16，104；18，36}和{55，71；91，93}个体重叠配对；而在 103 尾个体亲缘关系重建过程中，只有 2 号个体没有找到任何同胞关系。

### 2.5 繁育体系的构建

无论采用哪种计算方法，目的都是重建同胞关系，那么在进行繁育配组时将这些同胞对分割成两个繁育群体，这样的繁育策略操作起来也相对简单。配组原则如下：由于繁育亲本雄性个体较少，首先，考虑将雄性个体平均分割到 AB 两组，同时尽量避免将有同胞关系的兄弟分配在同一组；其次，考虑兄妹关系，将与 A 组雄性个体有关系的雌性个体分配到 B 组，反之，将与 B 组雄性个体有关系的雌性个体分配到 A 组，可以允许组内存在一定比例的姐妹关系；最后，如果某个雌性个体与 A、B 两组某几个雄性个体同时存在同胞关系的话，则淘汰该个体，反之亦然。

基于以上原则，两种方法产生了两种分配方案，其中 28 尾雄性个体均参与配组。在 Likelihood 分配方案中，剔除了 21 和 46 号两个雌性个体，同样地，在 2-allele 组合优化法中，剔除了 25 和 83 号两个雌性个体。

虽然两种计算方法重建的同胞关系不尽相同，但通过比对两种方法最终的分配结果发现，兄妹对被成功分割的一致性为 85%（组合优化法中鉴定的 20 对兄妹组合中，有 3 对在 Likelihood 法中被分配到同一组内），而姐妹组合经过调整后的一致性也高达 86%以上。鉴于兄妹对不能并存的原则，最终的繁育方案采纳组合优化法的分组结果，并立即将结果反馈到繁育中心，根据每条亲鱼的电子标记将 101 尾亲鱼(剔除了两个雌性个体)分配到 A、B 两个繁育池中催产繁育。

## 3 讨 论

### 3.1 捕捞繁育与近亲交配

捕捞繁育计划虽然可以快速恢复群体数量，但是由于鱼类怀卵量大，很难避免近亲交配的发生。如果繁育亲本间缺乏相应的系谱信息或遗传数据，人工繁育势必增加近亲交配的风险，导致后代相似度增加并偏离基础群体的遗传多样性(Kozfkay et al, 2008)。作者通过对人工繁育大黄鱼$F_2$及$F_3$的遗传差异分析显示，经过累代繁殖一代，两者的遗传分歧就会增加约 1%，逐步偏离原始亲本的遗传组成(Chang, 2008b)。因此，在进行人工繁育前，管理者不仅要掌握繁育亲本的繁殖生物学知识，而且要借助遗传工具分析这些亲本的亲缘关系，使这些有限的繁育亲本繁衍出优良的后代，不仅可以扩大种群数量，也为资源的永续利用提供保障。

### 3.2 亲缘关系重建与统计模型的选择

在诸多的统计方法中，选择合适的统计模型是十分重要的。进行亲缘关系分析的方法主要可以分为两大类: 相似度估测法和个体关系类别分配法(Blouin, 2003)。相似度估测法是指个体间在全基因组水平血源统一（identity by descent, IBD）的相关度，主要检测指标包括相似系数和似然率(Kozfkay

et al, 2008; Blouin, 2003)；个体关系类别分配法是指特定的系谱关系，比如同胞关系、堂兄妹关系，可以采用似然率法、等位基因共享及分割法（partition method）（Blouin, 2003；Butler et al, 2004）。Kays et al (2000)认为，对于亲缘关系相近的一群个体采用相似度估测法进行系谱分析，会对估测结果产生较大的偏差。考虑到本研究实验材料亲缘关系非常近（全或半同胞关系），因此我们选择指定关系类别法进行同胞重建分析。Van De Casteele et al (2001)认为没有一种方法能够满足所有要求，不同的方法在不同的群体组成中表现各不相同。因此，建议进行此类研究最好多选用几种方法进行对比分析。似然率法每次只考虑两个个体（dyads）的关系类别，如A和B是同胞关系，B和C也是同胞关系，但A和C不一定是同胞关系(Fernandez & Tora, 2006)。本研究手动追踪关系链发现103尾个体中有97尾个体互相存在间接关系，但这种做法肯定不适合大样本，除非编写小程序辅助追踪关系链。然而，采用似然率法最主要的优点在于该方法允许标记间存在连锁关系，只要通过Markov Chain模拟检测消除偏差即可(Blouin, 2003)。本研究有一部分编号“LYC”系列的标记已定位在大黄鱼连锁图谱上，而且之间不存在连锁关系(Ning et al, 2007)，但编号“HLJ”系列的标记在基因组中的分布、自身连锁关系及与“LYC”标记之间连锁关系尚不清楚，而连锁不平衡检验也证实某些标记的某些等位基因间存在一定程度的连锁。这种情况下，采用5 000次模拟检验基本可以保证结果的可靠性。相关研究表明，如果采用似然率统计法，接受主要假设FS, 拒绝无效假设UR, 至少需要20个高多态性的微卫星标记；接受主要假设HS，拒绝FS/UR，至少需要50个此类标记(Blouin, 2003)。本研究使用了23个微卫星标记，但是有7个标记的等位基因数低于5个（表2），标记信息量的不足可能降低区分不同关系类别的能力。2-allele组合优化法是基于二倍体生物等位基因遗传的简单规律设计的，即，一个子代在一个座位只能遗传到父母双方之一的一个等位基因。因此，一个个体在某个座位分配给双亲之一的等位基因数不可能超过两个(Ashley et al, 2008)。应用组合优化法重建同胞对的限制性条件则是数据必须符合无基因型错误和座位发生突变两种情况。但是2-allele组合优化法由于不依赖等位基因频率，因此多态性低的微卫星标记也适用此方法(Berger-Wolf et al, 2007)。

综上所述，两种方法各有优缺点，同胞重建的结果也不尽相同，但是都能够从不同角度反映样本之间的亲缘关系，而且比对分析的结果基本保持一致，这为避免繁育亲本之间的近亲交配提供了理论依据。

### 3.3 繁殖成功率与亲本相似度

Amos et al (2001)通过对领航鲸（*Globicephala melas*）、灰海豹（*Halichoerus grypus*）和漂泊信天翁（*Diomedea exulans*）父母本的遗传相似度检测后发现，父母本亲缘关系越相近，生产后代数量越少，即，繁殖成功率与亲本相似度呈负相关性。虽然未见有关鱼类繁殖成功率与亲本亲缘关系远近是否存在负相关的报道，但是通过子代生长对比实验同样可以证明与此相似的论据。黑龙江水产研究所孙效文领导的课题组利用个体间遗传距离作为规避近交的判定原则，连续两年的实验证明，镜鲤（*Cyprinus carpio* L）规避近交子代的体重增长率比对照组快14.81%~63.71%（未发表资料）。作者采用同样的方法于2008年对189尾大黄鱼繁育亲本进行了配组，结果同批对照组子代在疾病暴发期间全部死亡，实验组子代不仅近一半个体成活，而且生长速率赶超了比其早繁殖15 d的对照组子代（Chang, 2008b）。以上结果从另一个角度间接证明了繁殖成功率与亲本相似度存在负相关这一论据。

本研究于2009年采用了与2008年不同的剖析大黄鱼繁育亲本亲缘关系的方法，但旨在通过连续两年的规避近交实验，摸索出一套更符合养殖大黄鱼现状的繁育策略，从而更好地推进大黄鱼养殖产业的蓬勃发展。

## 参考文献：


Almudevar A, Field C. 1999. Estimation of single-generation sibling relationships based on DNA markers[J]. *J Agric Biol Environ Statistics*, **4**: 136-165.

Amos W, Wilmer JW, Fullard K, Burg M, Croxall JP, Bloch D, Coulson T. 2001. The influence of parental relatedness on reproductive success[J]. *Proc R Soc Lond B*, **268**: 2021-2027.

Ashley MV, Caballero IC, Chaovalitwongse W, DasGupta B, Govindan P, Sheikh SI, Berger-Wolf TY. 2009. KINALYZER, a computer program

for reconstructing sibling groups[J]. *Mol Ecol Resour*, Online publication.

Berger-Wolf TY, Sheikh SI, DasGupta B, Ashley M, Caballero IC, Chaovalitwongse W, Putrevu SL. 2007. Reconstructing sibling relationships in wild populations[J]. *Bioinformatics*, **23**: I49-I56.

Blouin MS. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations[J]. *Trends Ecol Evol*, **18**: 503-511.

Butler K, Field C, Herbinger CM, Smith BR. 2004. Accuracy, efficiency and robustness of four algorithms allowing full sibship reconstruction from DNA marker data[J]. *Mol Ecol*,**13**: 1589-1600.

Chang YM, Ding L, Wang WW, He JG, Liang LQ, Lei QQ. 2008a. Isolation and characterization of 11 microsatellite markers for the large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*[J]. *Conserv Genet*, DOI 10.1007/s10592-008-9708-9.

Chang YM. 2008b. Development and application of microsatellite markers in common carp, Chinese mitten crab and large yellow croaker[D]. Ph.D. thesis, Sun Yat-sen University,Guangzhou.[常玉梅. 2008b. 鲤鱼、中华绒螯蟹和大黄鱼微卫星标记的开发与应用研究. 中山大学博士论文.]

Fernandez J, Tora MA. 2006. A new method to estimate relatedness from molecular markers[J]. *Mol Ecol*, **15**: 1657-1667.

Goodnight K, Queller DC. 1999. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers[J]. *Mol Ecol*, **8**: 1231-1234.

Guo W, Wang ZY, Wang YL, Zhang ZP, Gui JF. 2005. Isolation and characterization of six microsatellite markers in the large yellow croaker (*Pseucosciaena crocea* Richardson) [J]. *Mol Ecol Notes*, **5**: 369-371.

Kays RW, Gittleman JL, Wayne RK. 2000. Microsatellite analysis of kinkajou social organization[J]. *Mol Ecol*, **9**: 743-751.

Konovalov DA, Manning C, Henshaw MT. 2004. KINGROUP: A program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers[J]. *Mol Ecol Notes*, **4**: 779-782.

Kozfkay CC, Campbell MR, Heindel JA, Baker DJ, Kline P, Powell MS, Flagg T. 2008. A genetic evaluation of relatedness for broodstock management of captive, endangered Snake River sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*[J].*Conserv Genet*, **9**: 1421-1430.

Li Q, Park CJ, Kijima A. 2003. Allelic transmission of microsatellites and application to kinship analysis in newly hatched Pacific abalone larvae[J]. *Fish Sci*, **69**: 883-889.

Ning Y, Liu XD, Wang ZY, Guo W, Li YY,Xie FJ. 2007. A genetic map of large yellow croaker *Pseucosciaena crocea*[J]. *Aquaculture*, **264**: 16-27.

Norris AT, Bradley DG, Cunningham EP. 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers[J]. *Aquaculture*, **182**: 73-83.

Rousset F. 2008. Genepop’007: A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux[J]. *Mol Ecol Resour*, **8**: 103-106.

Sekino M, Saitoh K, Yamada T, Kumagai A, Hara M, Yamashita Y. 2003. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program[J]. *Aquaculture*, **221**: 255-263.

Van De Casteele T, Galbusera P, Matthysen E. 2001. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators[J]. *Mol Ecol*, **10**: 1539-1549.

Xu KD, Liu ZF. 2007. The current stock of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* in the East China sea with respects of its stock decline[J]. *J Dalian Fish Univ*, **22**(5):392-396.[徐开达,刘子藩. 2007. 东海区大黄鱼渔业资源及资源衰退原因分析. 大连水产学院学报，**22**（5）：392-396.]

Xu SB, Tao YF, Yang ZQ, Chu JY. 2002. Quickly DNA silver staining and gel conversation[J]. *Hereditas*, **24**(3): 335-336.[许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 褚嘉祐. 2002. 简单快速的DNA银染和胶保存方法. 遗传, **24**(3): 335-336.]

Yeh FC, Yang R. 1999. Popgene Version 1.31: Microsoft Window Based
freeware for Population Genetic Analysis[M]. Canada: University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International Forestry Research.

Zhang CL, Liu JF, Li YC, Chen Z. 2003. Analysing the present condition and countermeasure of cultured large yellow croaker Pseudosciaena crocea in Fujian Province[J]. *J Shanghai Fish Univ*, **11**（1）：77-83.[张彩兰，刘家富，李雅璀，陈 植. 2002. 福建省大黄鱼养殖现状分析与对策. 上海水产大学学报，**11**（1）：77-83.]